

# 超声辅助双水相法提取葡萄籽中原花青素

胡兴佳<sup>1</sup>, 郭小敏<sup>1</sup>, 王子敏<sup>1</sup>, 刘雪聪<sup>1</sup>, 韩 静<sup>1\*</sup>, 梁仲雄<sup>2</sup>

<sup>1</sup>沈阳药科大学, 沈阳 110016; <sup>2</sup>云南成满生物科技有限公司, 大理 671600

**摘要:**采用浊点法确定硫酸铵-乙醇-水和磷酸二氢钠-乙醇-水体系的相图, 比较确定提取介质, 并以提取率为指标, 通过单因素试验和响应面法考察超声功率、超声时间、料液比对提取率的影响。结果表明, 原花青素的最佳提取工艺条件为  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  23% (w/w), 乙醇 20% (w/w), 超声功率 750 W, 超声时间 44.5 min, 料液比 1:28 (g/g), 提取温度 25 °C。在此条件下提取率为 9.04 mg/g。原花青素对 DPPH 自由基有较强的清除能力, 且超声辅助双水相提取葡萄籽中原花青素抗氧化能力明显高于一般回流提取。该工艺稳定可行, 结果重现性较好。

**关键词:** 超声辅助; 双水相系统; 葡萄籽; 原花青素; 响应曲面法

中图分类号: R94; Q946.91

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.S.012

## Extraction of Procyanidins from Grape Seeds Using Ultrasonic-assisted Aqueous Two-phase System

HU Xing-jia<sup>1</sup>, GUO Xiao-min<sup>1</sup>, WANG Zi-min<sup>1</sup>, LIU Xue-cong<sup>1</sup>, HAN Jing<sup>1\*</sup>, LIANG Zhong-xiong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Shenyang Pharmaceutical University, Liaoning Shenyang 110016, China;

<sup>2</sup>Yunnan Chengman Biotechnology Co., Ltd., Yunnan Dali 671600, China

**Abstract:** The phase diagrams of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  or  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + ethanol + water systems were developed by titration method. The effects of ultrasonic power, ultrasonic time and ratio of material to solution, on the extraction yield, were studied by single factor experiments and response surface methodology. The result showed that the optimal extraction conditions were  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  concentration of 23% (w/w), ethanol concentration of 20% (w/w), ultrasound input power of 750 W, ultrasound time of 44.5 min, ratio of solvent to solid of 28 (g/g) and extraction temperature of 25 °C. The extraction yield was 9.04 mg/g under the optimal conditions. The Procyanidins has a strong ability of scavenging DPPH, and the antioxidant capacity of procyanidins extracted from grape seeds using ultrasonic-assisted aqueous two-phase system significantly higher than that of general reflux extraction. The technology were stable and feasible.

**Key words:** ultrasonic-assisted; aqueous two-phase system; grape seeds; procyanidins; response surface methodology

原花青素是一类广泛存在于苹果、松树皮、葡萄籽等植物的天然抗氧化剂<sup>[1-3]</sup>, 具有清除自由基、抗炎、抗肿瘤等作用<sup>[4,5]</sup>。目前, 原花青素已被广泛应用于食品、化妆品、保健品和药品中<sup>[6]</sup>。葡萄籽是原花青素的主要来源, 而葡萄籽作为葡萄酒的下脚料, 无法得到二次利用, 因而有必要开发一种绿色、高效的提取方法。

已报道的从葡萄籽中提取原花青素的方法主要有溶剂提取法、微波浸提法<sup>[7]</sup>、超声提取法<sup>[8]</sup>和超临界  $\text{CO}_2$  萃取法<sup>[9]</sup>。超声辅助提取利用超声波强化提取分离过程, 能有效地缩短提取时间, 提高产品

得率, 还可以减少化学与物理危害, 提高产品质量<sup>[10]</sup>。双水相系统是一种公认的高效、绿色、低能耗的现代萃取纯化技术, 其操作条件温和、易于放大、可连续操作, 目前已成功在蛋白质、核酸等生物制品的分离纯化及生物分析等方面得到应用<sup>[11,12]</sup>。本文采用超声辅助双水相法提取葡萄籽中原花青素, 通过单因素及 Box-Behnken 响应曲面设计优化提取工艺条件, 并通过 DPPH 自由基清除试验对比传统回流提取原花青素的抗氧化活性, 以期原花青素的提取及利用提供新的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

葡萄籽(沈阳)、原花青素对照品(天津尖峰生物科技有限公司, 纯度  $\geq 95\%$ )、儿茶素标准品(美

收稿日期: 2017-10-27

接受日期: 2018-04-04

基金项目: 国家基础科学人才培养基金(J1103606); 辽宁省自然科学基金(201602692)

\* 通讯作者 Tel: 86-24-43520212; Email: hj-8080@163.com

国 Sigma 公司, 纯度  $\geq 98\%$ )、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、乙醇等其他化学试剂均为分析纯。

## 1.2 仪器与设备

RRHP-200 型万能高速万能粉碎机, 欧凯莱芙(香港)有限公司; BSA-24S 电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司, 0.001g; JY92-2D 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; UV2800PC 紫外可见分光光度计, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司。

## 1.3 原花青素含量测定

采用香草醛-硫酸法测定原花青素含量, 以儿茶素为对照, 在 500 nm 处测定对照品溶液吸光值<sup>[13]</sup>。

## 1.4 双水相相图

### 1.4.1 硫酸铵-乙醇-水体系

精确称取 3.5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 6.0 g 蒸馏水溶解, 用滴管缓慢滴加乙醇, 不断振荡使其充分混合, 静置, 观察是否分层, 记录分相时加入的乙醇质量和体系总质量, 计算  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和乙醇的质量分数; 继续滴加乙醇, 不断振荡使其充分混合, 观察是否出现浑浊, 记录出现浑浊时加入的乙醇质量和体系总质量, 计算  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和乙醇的质量分数。继续滴加无水乙醇, 重复以上过程, 直至无法形成双水相体系。以乙醇质量分数为纵坐标,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  质量分数为横坐标作图, 将各点连线即为硫酸铵-乙醇双节曲线。

### 1.4.2 磷酸二氢钠-乙醇-水体系

精确称取 3.5 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  于 25 mL 具塞试管中, 加入 5.0 g 蒸馏水, 重复 1.4.1 操作, 得磷酸二氢钠-乙醇双节曲线。

## 1.5 双水相体系的配制

### 1.5.1 操作方法

将葡萄籽在 50 °C 下干燥至恒重, 粉碎, 过 80 目筛得葡萄籽粉末, 于 4 °C 保存。根据双水相相图, 准确称取一定质量  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  或  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、蒸馏水和乙醇于 25 mL 具塞试管中, 使其总质量为 20.0 g。加入 1.0 g 葡萄籽粉末, 涡旋混合 2 min, 25 °C 水浴静置 1 h, 4000 rpm 离心 10 min, 分别测定上相和下相的浓度和体积, 计算 K 和 R。

$$K = \frac{C_t}{C_b}; R = \frac{C_t V_t}{C_t V_t + C_b V_b}$$

式中, K 是分配系数, R 是萃取率; 溶质在上相的浓度  $C_t$ , mg/mL; 溶质在上相的体积  $V_t$ , mL; 溶质在下相的浓度  $C_b$ , mg/mL; 溶质在下相的体积  $V_b$ ,

mL。

### 1.5.2 最佳双水相体系的选择

根据  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  双水相相图, 保持乙醇质量分数为 20% 恒定不变, 改变无机盐的质量分数 (20%、21%、22%、23% 和 24%), 考察无机盐种类和浓度对 K 和 R 的影响; 保持  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  质量分数 23% 恒定不变, 改变乙醇质量分数 (17%、18%、19%、20%、21%、22% 和 23%), 考察乙醇质量分数对 K 和 R 的影响。

## 1.6 超声辅助双水相提取

### 1.6.1 提取方法

准确称取 4.6 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、3.6 g 乙醇、11.8 g 蒸馏水和 1.0 g 葡萄籽粉末于 25 mL 双层反应釜中, 将超声探头 (超声频率 40 kHz, 超声功率 0-1000 W, 探头直径 6 mm) 置于液面下 1.5 cm, 反应釜夹层通入 25 °C 循环水使反应温度维持在 25 °C。将提取液 4000 rpm 离心 10 min, 测定上相体积和浓度。40 °C 旋蒸除上相中乙醇, 加入甲醇使甲醇质量分数为 80%, 静置 30 min 除盐, 4000 rpm 离心 10 min, 取上清液 40 °C 旋蒸除甲醇, 提取物在 40 °C、0.1 MPa 下真空干燥至恒重。

$$Y = \frac{C_t V_t}{M_s}$$

式中, Y 是提取率; 原花青素在上相中的浓度  $C_t$ , mg/mL; 原花青素在上相中的体积  $V_t$ , mL; 加入的葡萄籽粉末的质量  $M_s$ , g。

### 1.6.2 单因素试验

保持料液比 1:20 (g/g), 提取时间 20 min 不变, 考察超声功率 100、200、400、600、800 和 1000 W 对提取率的影响; 保持料液比 1:20 (g/g), 超声功率 800 W, 考察提取时间 10、20、30、45、60 和 90 min 对提取率的影响; 保持超声功率 800 W, 提取时间 45 min 不变, 考察料液比 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25 和 1:40 (g/g) 对提取率的影响。

### 1.6.3 响应面法试验设计

响应面优化试验选择超声功率 ( $X_1$ , W)、超声时间 ( $X_2$ , min) 和料液比 ( $X_3$ ) 三个因素为优化对象, 以提取率为响应值。采用 Box-Behnken 响应面试验设计, 利用 Design-Expert 8.0.6.1 软件设计三因素三水平的响应面试验, 3 个中心点, 共有 15 组试验。响应面试验设计水平及编码见表 1。

表 1 响应面分析实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiments

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
(X <sub>1</sub> ) 超声功率 Ultrasound power (W)	600	800	1000
(X <sub>2</sub> ) 超声时间 Ultrasound time (min)	30	45	60
(X <sub>3</sub> ) 液料比 Liquid to solid ratio (g/g)	20	25	30

### 1.7 DPPH 自由基清除能力测定

以 95% 乙醇配制  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 DPPH 溶液, 取 0.2 mL DPPH 溶液, 加入 0.2 mL 不同浓度原花青素抗氧化剂, 混匀,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴避光反应 30 min, 在 517 nm 下测定吸光值。DPPH 自由基的清除率计算公式:

$$E(\%) = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\%$$

其中,  $A_0$  是不加提取液的 DPPH 溶液的吸光值;  $A_1$  是提取液显色后吸光值;  $A_2$  是不加 DPPH 溶液的吸光值。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线的绘制

在 500 nm 处测得各对照品溶液的吸光值, 以儿茶素为对照, 得到原花青素浓度与吸光值的回归方程:  $Y = 1.597X + 0.005$ ,  $r^2 = 0.9995$ ,  $Y$  为 500 nm 处吸光值,  $X$  为原花青素浓度 (mg/mL)。

### 2.2 双水相相图

如图 1 所示, 成相线与盐析线将整个区域分为

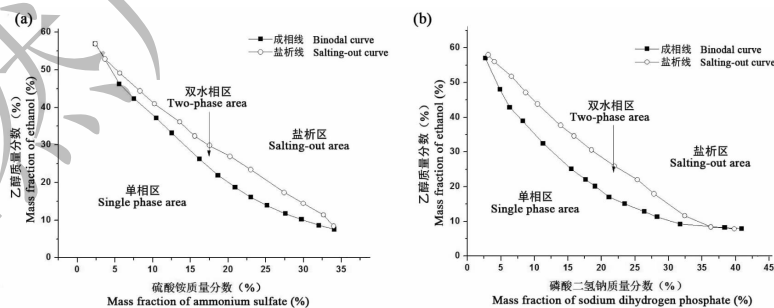


图 1 双水相相图 (a) 硫酸铵-乙醇 (b) 磷酸二氢钠-乙醇

Fig. 1 The phase diagrams (a)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ethanol (b)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -ethanol

至此, 从葡萄籽中提取原花青素的最佳双水相条件为以  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为成相盐,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  质量分数 23%, 乙醇质量分数为 20%。

### 2.4 单因素试验

三个区域: 单相区、双水相区和盐析区。以  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  相图为例, 当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  质量分数为 20% 时, 随着乙醇质量分数的增加, 体系依次呈澄清透明溶液-双水相体系-盐析的变化。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  的双水相区域无明显区别, 因此根据 K 和 R 来选择最佳无机盐。

### 2.3 最佳双水相体系的选择

由图 1 可知, 当乙醇质量分数为 20% 时, 在保证形成双水相体系的前提下, 无机盐的质量分数变化范围较大, 综合考虑试验结果与成本, 采用乙醇的质量分数为 20% 来确定最佳盐种类和浓度。如图 2-a 所示, 当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的质量分数为 23% 时, K (33.89) 和 R (95.26%) 达最大值, 而当  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  质量分数为 22% 时, K (8.22) 和 R (89.1%) 达最大值, K 和 R 均低于  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 故后续研究采用  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  作为成相盐, 质量分数为 23%。如图 2-b 所示, K 和 R 均随乙醇质量分数的增加而呈先增加后下降的变化, 当乙醇质量分数为 18% 时, K 和 R 达最大值, 分别为 44.37 和 95.41%。

### 2.4.1 超声功率对提取率的影响

超声功率对提取率的影响如图 3 所示, 随着功率的增加, 提取率先增加后减小, 当超声功率为 800 W 时, 提取率达  $8.05 \text{ mg/g}$ 。超声功率越大, 超声波

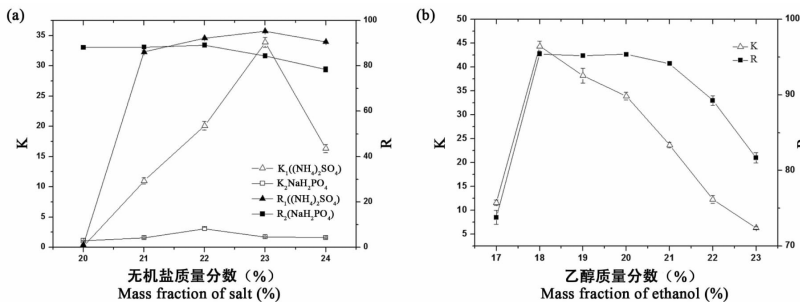


图2 无机盐(a)和乙醇质量分数(b)对K和R的影响

Fig. 2 Effect of type and concentration of salt (a) and ethanol (b) concentration on K and R

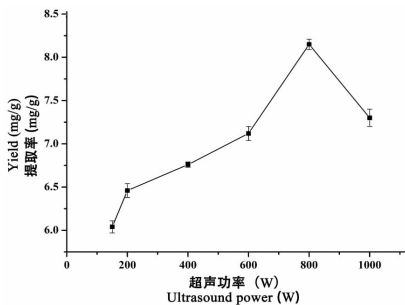


图3 超声功率对提取率的影响

Fig. 3 Effect of ultrasound power on yield of procyanidins

的空穴效应、热效应和机械作用越大,但超声功率过大会导致某些天然产物的降解,降低提取效率<sup>[12]</sup>。

2.4.2 超声时间对提取率的影响

超声时间会影响超声波的空穴效应、热效应和机械作用的作用时间进而会影响原花青素的提取效率。如图4所示,在45 min之前,原花青素的提取率随超声时间的增加而增加,在45 min时达到最大值;继续延长超声时间,提取率则降低。这是因为超声能够加速细胞中的原花青素和其他物质的溶出,但超声时间过长会导致原花青素的降解。

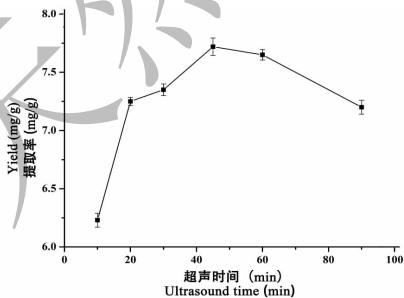


图4 超声时间对提取率的影响

Fig. 4 Effect of ultrasound time on yield of procyanidins

2.4.3 料液比对提取率的影响

如图5所示,当料液比为1:5~25时,原花青素

的提取率随料液比的增加而显著增加,料液比为1:40时,提取率达最大值,因为对一定量的葡萄籽粉末来说,溶剂用量的增加降低了溶剂中原花青素的浓度,原料与溶剂接触界面的浓度差增加,原花青素与溶剂之间的扩散速度增大,故提取率增大。

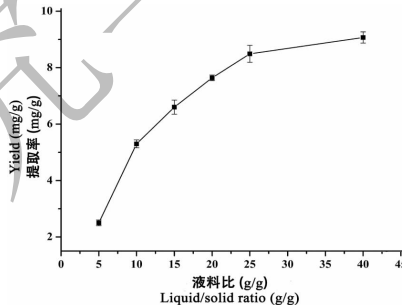


图5 料液比对提取率的影响

Fig. 5 Effect of ratio of liquid to solid on yield of procyanidins

2.5 响应面试验分析

2.5.1 响应面设计与结果分析

2.5.2 模型方程的建立及显著性检验

利用响应面法设计软件 Design-Expert 8.0.6.1 对表2中的实验结果进行回归分析,对 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 进行回归拟合后,得到提取率与超声功率( $X_1$ )、超声时间( $X_2$ )和料液比( $X_3$ )的二次多项式回归方程为: $Y = 8.97 + 0.052 X_1 + 0.11 X_2 + 0.5 X_3 - 0.017 X_1 X_2 + 0.0075 X_1 X_3 - 0.0075 X_2 X_3 - 0.93 X_1^2 - 0.27 X_2^2 - 0.49 X_3^2$ ,由回归方程可知,各个变量系数分为正值和负值。若系数为正值,说明响应值与该变量呈正相关;若系数为负值,说明响应值与该变量呈负相关。此外,回归方程中二次项系数均为负值,说明该方程的抛物面开口向下(如图6),具有极大值点,可进行最优化分析得到最大提取率时对应的提取条件。

表 2 响应曲面分析试验设计及结果

Table 2 The experimental design and results of response surface analysis

试验号 Run	因素及水平 Factor and level			提取率 Yield (mg/g)
	X <sub>1</sub> 超声功率 Power (W)	X <sub>2</sub> 超声时间 Time (min)	X <sub>3</sub> 液料比 Liquid/solid ratio (g/g)	
1	600	30	25	7.59 ± 0.02
2	1000	30	25	7.74 ± 0.08
3	600	60	25	7.83 ± 0.14
4	1000	60	25	7.91 ± 0.02
5	600	45	20	7.03 ± 0.01
6	1000	45	20	7.11 ± 0.02
7	600	45	30	7.98 ± 0.02
8	1000	45	30	8.09 ± 0.05
9	800	30	20	7.57 ± 0.10
10	800	60	20	7.82 ± 0.04
11	800	30	30	8.61 ± 0.02
12	800	60	30	8.83 ± 0.02
13	800	45	25	8.95 ± 0.15
14	800	45	25	9.00 ± 0.11
15	800	45	25	8.96 ± 0.09

表 3 方差分析表

Table 3 The analysis of variance

方差来源 Source	自由度 df	提取率 Yield (mg/g)			
		平方和 Sum of Squares	F 值 F value	p-值 p-Value	显著性 Significant
模型 Mode	9	6.04	872.06	< 0.0001	极显著 Significant
X <sub>1</sub>	1	0.022	28.64	0.0031	**
X <sub>2</sub>	1	0.097	125.71	< 0.0001	**
X <sub>3</sub>	1	1.98	2571.49	< 0.0001	**
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	1.225E-03	1.59	0.2628	
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1	2.250E-04	0.29	0.612	
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1	2.250E-04	0.29	0.612	
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	3.18	4136.23	< 0.0001	**
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	0.28	359.35	< 0.0001	**
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	0.88	1145.46	< 0.0001	**
残差 Residual	5	3.850E-03			
失拟项 Lack of fit	3	2.450E-03	1.17	0.4924	不显著 Not significant
纯误差 Pure error	2	1.400E-03			
总和 Cor total	14	6.05			
R <sup>2</sup>	0.9994				
R <sup>2</sup> <sub>Adj</sub>	0.9982				

注: \* P &lt; 0.05 为影响显著, \*\* P &lt; 0.01 为影响极显著, P &gt; 0.10 影响不显著。

Notes: \* P &lt; 0.05, significant; \*\* P &lt; 0.01, more significant; P &gt; 0.10, not significant.

从回归模型 ANOVA 分析(表 3)可见,该模型极显著( $P < 0.0001$ ),失拟项不显著  $P = 0.4924 > 0.05$ ,说明模型适合此条件的优化;模型校正决定系数  $R^2_{Adj} = 0.9982$ ,说明该模型能解释 99.82% 的响应值的变化情况;相关系数  $R^2 = 0.9994$ ,说明该模型拟合度良好,预测值与实测值之间具有较好的相关性,可用回归方程代替实验真实点对实验结果进行

预测和分析。F 值越大,则因素对响应值的影响越显著。从 F 值的大小可以看出,三个因素对提取率的影响顺序依次是  $X_3 > X_2 > X_1$ ,即料液比 > 超声时间 > 超声功率。交互项  $X_1X_2$ 、 $X_2X_3$  和  $X_1X_3$  影响不显著。二次项  $X_1^2$ 、 $X_2^2$  和  $X_3^2$  影响极显著,表明各影响因素对包封率的影响并非简单的线性关系。

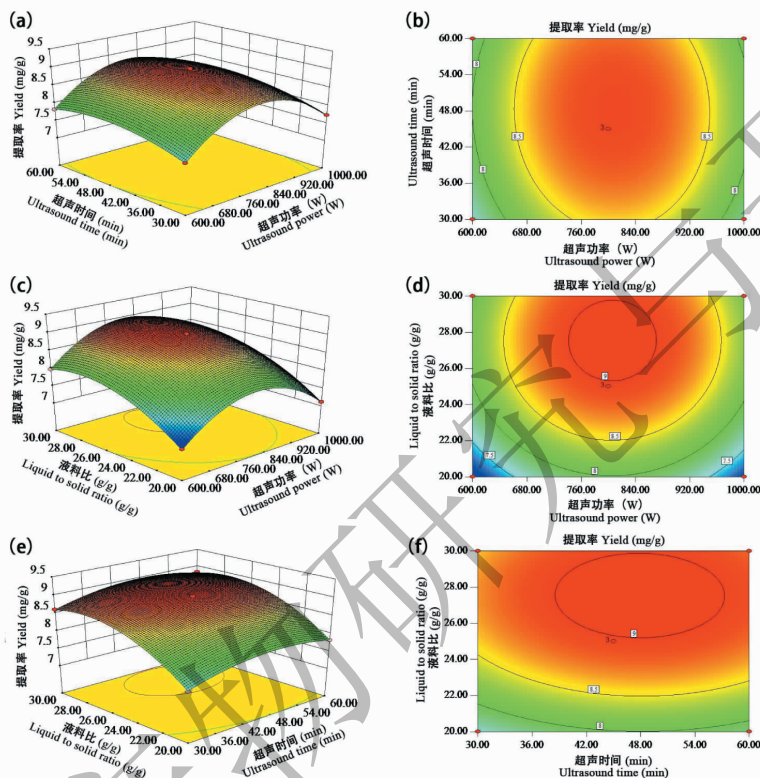


图 6 各因素交互作用响应面图和等高线图

Fig. 1 Response surface and contour plots showing the pairwise interaction effects of various hydrolysis conditions on the extraction yield of procyanidins

注:超声功率和超声时间对提取率交互影响响应曲面图(a)和等高线图(b);超声功率和料液比对提取率交互影响响应曲面图(c)和等高线图(d);超声时间和料液比对提取率交互影响响应曲面图(e)和等高线图(f)

Note: Response surface diagram (a) and contour plot (b) for yield as a function of ultrasound power and time; Response surface diagram (c) and contour plot (d) for yield as a function of ultrasound power and liquid to solid ratio; Response surface diagram (e) and contour plot (f) for yield as a function of ultrasound time and liquid to solid ratio

根据回归方程,利用 Design-Expert 8.0.6.1 软件得到  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  间的响应面图和交互作用图,如图 6 所示。当响应值最大时,对应的  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  的值分别为 750 W、44.5 min、1:28,即最佳提取条件为:超声功率 750 W、超声时间 44.5 min 与料液比 1:28,此条件下的提取率为 9.00 mg/g。

### 2.5.3 最佳工艺条件验证

为了检验结果可靠性,按上述条件平行制备并提取三次,提取率分别为 9.14、9.01、8.96 mg/g,平

均值为 9.04 mg/g,理论预测值为 9.00 mg/g,与理论预测值相比,其相对误差为 0.44%。由此可知,用该模型优化原花青素的提取条件稳定可行。

### 2.6 不同提取工艺提取的原花青素抗氧化活性

将相同质量葡萄籽粉末通过回流提取、超声辅助双水相提取得到的提取液定容到 50 mL,测得原花青素含量分别为 15.7、18.2 mg,说明超声辅助双水相提取的原花青素较普通回流提取含量更高,同时,以原花青素提取液浓度为横坐标,清除率为纵坐

标作图(如图7),观察其抗氧化活性变化。

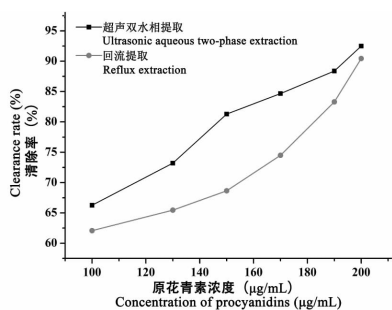


图7 不同提取工艺原花青素抗氧化活性

Fig. 7 Antioxidant activity of procyanidins from different extraction processes

由图7可知,回流提取与超声辅助双水相提取得到的原花青素对DPPH自由基均有较强的清除能力。浓度与DPPH自由基清除率存在正相关关系,且超声辅助双水相提取的原花青素的清除能力显著高于一般回流提取。当原花青素浓度为200 µg/mL时,超声辅助提取法的清除率为92.5%,回流提取为89.9%。

### 3 结论

本实验采用响应面分析法优化葡萄籽原花青素的提取工艺,在超声功率、超声时间和料液比3个因素中,超声时间和料液比对葡萄籽原花青素的提取率的影响达到极显著水平,超声功率达到显著水平,3个因素的主次关系为:料液比>超声时间>超声功率。利用Design-Expert 8.0.6.1软件对试验数据进行分析,结果表明,葡萄籽原花青素超声辅助双水相提取最佳条件为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  23% (w/w),乙醇20% (w/w),超声时间44.5 min,超声功率750 W,料液比1:28,提取温度25 °C,在此条件下,原花青素得率理论预测值为9.00 mg/g,实测值为9.04 mg/g。且超声辅助双水相提取的原花青素抗氧化能力明显高于一般回流提取。本文为葡萄籽中原花青素的开发与利用提供一定的参考价值 and 理论基础。

#### 参考文献

1 Aldini G, Carini M, Piccoli A, *et al.* Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio protection [J]. *Life Sci*, 2003, 73: 2883-2898.

2 Decorde K, Teisseder P, Sutra T, *et al.* Chardonnay grape seed procyanidin extract supplementation prevents high fat diet induced obesity in hamsters by improving adipokine imbalance and oxidative stress markers [J]. *Mol Nutr and Food Res*, 2009, 53: 659-666.

3 Shibusawa Y, Yanagida A, Isozaki M, *et al.* Separation of apple procyanidins into different degrees of polymerization by high speed counter current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 915: 253-257.

4 Joshi SS, Kuszynski CA, Bagchi M. Chemopreventive effects of grape seed proanthocyanidin extract on Chang liver cells [J]. *Toxicology*, 2000, 155: 83-90.

5 Carnesecchi S, Schneider Y, Lazarus SA, *et al.* Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells [J]. *Cancer Letters*, 2002, 175: 147-155.

6 Plumb GW, Pascual-teresa SD, Santos-buelga C, *et al.* Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation [J]. *Free Radical Res*, 1998, 29: 351-358.

7 Krishnaswamy K, Orsat V, Garepy Y, *et al.* Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from grape seeds (*Vitis vinifera*) [J]. *Food Bioprocess Tech*, 2013, 6: 441-455.

8 Ghafoor K, Choi Y H, Jeon J Y, *et al.* Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from arape (*Vitis vinifera*) Seeds [J]. *J Agri Food Chem*, 2009, 57: 4988-4994.

9 Zhang LF (张连富), Mou DH (莫德华), Du YS (杜彦山). Procyanidins: extraction and micro-encapsulation [J]. *J Sci Food Agr* (食品科技与农业), 2007, 87: 2192-2197.

10 Chemat F, Zill-e-Huma Z, Khan M K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction [J]. *Ultrasonic Sonochemistry*, 2011, 18: 813-835.

11 Soares R R, Vanalstine J M, Aires-barros M R. Partitioning in aqueous two-phase systems: analysis of strengths, weaknesses, opportunities and threats [J]. *Biotech J*, 2015, 10: 1158-1169.

12 Li Y, Fabiano-tixier A S, Tomao V, *et al.* Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2013, 20(1): 12-18.

13 Zao P (赵平), Song XJ (宋学娟), Zhang YP (张月萍). Determination of procyanidins content in grape seeds [J]. *Hebei Chem J* (河北化工), 2007, 30(1): 46-48.